

23 MAR 2005

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 15 OCT 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

BEST AVAILABLE COPY

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



5 bis, rue de Saint Pétersbourg

3800 Paris Cedex 08

téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

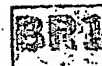
# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354\*02

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

CS 540 W 01/91

<b>REMISE DES PIÈCES</b> <b>DATE</b> 23 SEPT 2002 <b>LIEU</b> 75 INPI PARIS <b>N° D'ENREGISTREMENT</b> 0211718 <b>NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI</b> <b>DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI</b> 23 SEP. 2002		<b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE	
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b> 240052 D20617 BF		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b> Demande de brevet Demande de certificat d'utilité Demande divisionnaire Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N° Date N° Date N° Date	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>  PROCÉDE DE DETECTION DE MICROORGANISMES RESISTANTS A LA METICILLINE			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b> Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Domicile ou siège Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input checked="" type="checkbox"/> Personne physique  RAMBACH, Alain  73, Boulevard Montparnasse, 75006 PARIS  FRANCE Française N° de télécopie (facultatif) <input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

1er depot

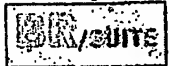
**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

  
N° 11354\*02

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Page suite N° .../...  
2/3



Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES  
DATE

23 SEPT 2002

LIEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0211718

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 220 W. 01/01/99

Vos références pour ce dossier (facultatif)

240052 BF

☒ **DÉCLARATION DE PRIORITÉ  
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE  
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE  
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☒ **DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)**

☐ Personne morale

☒ Personne physique

Nom  
ou dénomination sociale

LE COUSTUMIER ALAIN

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile  
ou  
siège

Rue

76, chemin des Junies, 46000 CAHORS

Code postal et ville

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ **DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)**

☐ Personne morale

☐ Personne physique

Nom  
ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile  
ou  
siège

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ **SIGNATURE DU DEMANDEUR  
OU DU MANDATAIRE  
(Nom et qualité du signataire)**

**VISA DE LA PRÉFECTURE  
OU DE L'INPI**

Réservé à l'INPI

RENTRE DES PIÈCES

DATE

LIEU

23 SEPT 2002

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0211718

DB 510 W / 010901

Vos références pour ce dossier :

(facultatif) 240052 BF

**5** MANDATAIRE (facultatif)

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

Cabinet REGIMBEAU

N° de pouvoir permanent et/ou  
de lien contractuel

Adresse

Rue

20, rue de Chazelles

Code postal et ville

75847 PARIS CEDEX 17

Pays

N° de téléphone (facultatif)

01 44 29 35 00

N° de télécopie (facultatif)

01 44 29 35 99

Adresse électronique (facultatif)

info@regimbeau.fr

**7** INVENTEUR(S)

Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques

Les demandeurs et les inventeurs  
sont les mêmes personnes

☒ Oui

☐ Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'Inventeur(s)

**8** RAPPORT DE RECHERCHE

Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)

Établissement immédiat  
ou établissement différé

☒  
☐

Paiement échelonné de la redevance  
(en deux versements)

Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt

☐ Oui  
☐ Non

**9** RÉDUCTION DU TAUX  
DES REDEVANCES

Uniquement pour les personnes physiques

☐ Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)

☐ Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la  
décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG

Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite »,  
indiquez le nombre de pages jointes

**10** SIGNATURE DU DEMANDEUR  
OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

921783

VISA DE LA PRÉFECTURE  
OU DE L'INPI

L'invention se rapporte à un nouveau milieu gélifié de détection de  
5 microorganismes résistants à la méticilline, dans lequel sont présents un  
antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines notamment de seconde ou  
troisième génération, et un agent chromogène portant un chromophore libéré après  
hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.

La détection systématique des *Staphylococcus aureus* résistants à la  
10 méticilline (aussi écrite méthicilline) (MRSA) est importante.

En effet, bien que les MRSA ne semblent pas plus virulents que les MSSA,  
(*Staphylocoques dorés* sensibles à la méticilline), leurs infections sont plus difficiles  
et onéreuses à traiter. Ceci est dû à ce que la méti-résistance confère la résistance à  
toutes les bêta-lactamines et que cette résistance est très souvent associée à des  
15 résistances à de nombreux autres antibiotiques antistaphylococciques majeurs (Lyon  
et Skurry, Microbiol. Rev. 51 ; 88 – 134)

Pour cette détection on a parfois utilisé des milieux de croissance gélosés  
supplémentés à la méticilline. Cette méthode est maintenant souvent abandonnée  
car elle détecte mal certaines souches MRSA, en particulier des souches  
20 hétérogènes dans lesquelles des populations bactériennes contiennent une  
proportion très faible de bactéries franchement résistantes à la méticilline (dans  
lesquelles 1 bactérie sur  $10^4$  ou  $10^8$  exprime la résistance). Cette méthode donne un  
nombre important de résultats faux négatifs.

L'utilisation de milieux de croissance gélosés supplémentés à l'oxacilline est  
25 fréquente mais, comme avec la méticilline, certaines souches sont difficiles à  
détecter.

De plus, pour que ces antibiotiques (méticilline, oxacilline) fonctionnent à  
peu près efficacement comme suppléments sélectifs, on est contraint de n'employer  
que certains milieux de croissance. En conséquence les milieux proposés à  
30 l'utilisateur sont par exemple des dérivés du Muller Hinton Agar ou du Mannitol  
Salt Agar. Malheureusement pour l'utilisateur ces milieux sont souvent peu  
discriminants pour l'espèce *S. aureus* ce qui diminue encore la sensibilité et la  
spécificité.

On a proposé des milieux de croissance gélosés supplémentés à la tobramycine ou l'ofloxacin, soit dans des bases peu discriminantes (dérivées du Mannitol salt Agar par exemple), soit dans la base très discriminante du CHROMagar Staph aureus, mais la corrélation avec la résistance à la méticilline est médiocre d'où un excès de faux positifs et de faux négatifs.

On utilise aussi la méthode de diffusion sur gélose, par exemple la gélose Mueller Hinton, qui consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'antibiotiques sur une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier. Il s'établit dans la gélose un gradient de concentration d'antibiotique autour de chaque disque. Après incubation, il se produit un halo d'inhibition autour de chaque disque qui permet de mesurer un diamètre, qui reflète la valeur de la CMI.

La présente invention se rapporte à un milieu de culture gélosé permettant de détecter les microorganismes résistants à la méticilline, et en particulier les staphylocoques, notamment les staphylocoques dorés, avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité.

Ainsi, dans le cadre de la présente invention, on utilise les capacités discriminantes des milieux chromogènes, en combinaison avec les propriétés des antibiotiques de la famille des céphalosporines de 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> génération, qui permettent de détecter les microorganismes résistants à la méticilline.

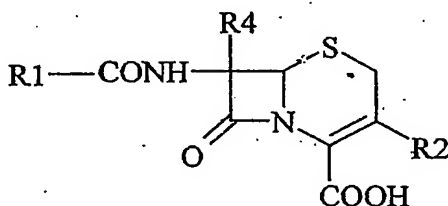
L'invention se rapporte donc à un milieu pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline, comprenant, outre des nutriments permettant la croissance desdits microorganismes, au moins un antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines de seconde ou troisième génération, et un agent chromogène libérant un chromophore après hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.

Les milieux de culture selon l'invention permettent une détection directe des microorganismes résistants à la méticilline, en raison de leur croissance sur le milieu selon l'invention et de la présence de(s) l'agent(s) chromogène(s), permettant de définir la nature du microorganisme. On n'a donc pas besoin d'étape supplémentaire de confirmation de la nature des microorganismes poussant sur le milieu selon l'invention.

Les milieux selon l'invention permettent la détection de bactéries résistantes à la méticilline, à partir d'un inoculum strié sur boîte, alors que la majorité des

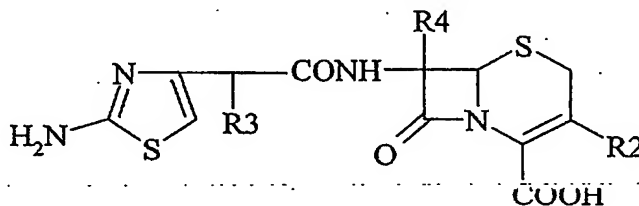
méthodes de l'art antérieur utilisent un dépôt d'environ  $10^4$  à  $10^5$  bactéries sur la gélose. On peut utiliser les milieux selon l'invention directement à partir d'un prélèvement à partir d'un patient, ou après une phase d'enrichissement.

Par céphalosporine de seconde ou troisième génération, on entend désigner les antibiotiques de la famille des céphalosporines, présentant une formule dérivée de la formule (I) suivante :



dans laquelle R2 est un groupement H, acétoxy-méthyle, éthyl-thiotétrazole, diméthyl-amino-éthyl-thiotétrazole, triazine, acétamino-pyridine (pyridinium), ou pyridinium substitué par un groupement carbamoyl, cyclo-pento-pyridinium, thiométhyl-acétoxy-thiazole, et R1 est un hétérocycle amino-2-thiazole, une  $\alpha$ -pipérazine-dione, un  $\alpha$ -sulfo-phényle..

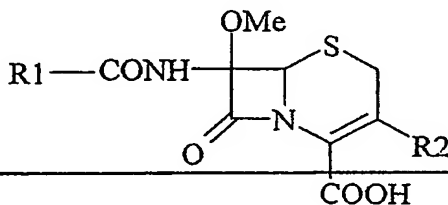
En particulier, on entend les composés présentant une formule



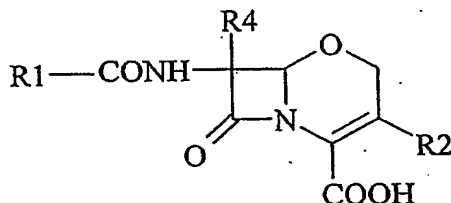
dans laquelle R3 est un groupement H ou un groupement  $\alpha$ -méthoxy-imino.

Dans un cas particulier, le groupement R4 est un hydrogène.

Les céphamycines sont des composés dans lesquels le groupement R4 est un radical  $\alpha$ -méthoxy, protégeant le noyau  $\beta$ -lactame de l'hydrolyse par les  $\beta$ -lactamases.



Les oxacephems sont des composés dans lesquels l'atome soufre du noyau céphem est remplacé par un atome d'oxygène, et sont considérés comme dérivés de la formule (I) présentée plus haut.



5 En général, pour ces composés, le groupement R4 est un  $\alpha$ -méthoxy.

Une définition des céphalosporines ainsi envisagées peut être trouvée dans Binger (Mécanisme d'Action des Bêta-lactamines, ( de la structure bactérienne à la structure de la molécule ), 1986 Roussel (Paris) éditeur, chapitre III pages 47-62, et chapitre IV pages 63-68), et dans l'ouvrage de Richmond (Beta-lactam antibiotics, 10 (the background to their use as therapeutic agents ), Hoechst Aktiengesellschaft, D-6230 Frankfurt (Main) 80 éditeur, 1981, chapitre 3 pages 55-65).

A titre accessoire, on peut noter que les céphalosporines de seconde 15 génération présentent un meilleur effet que les céphalosporines de première génération contre les bactéries Gram négatives et résistent mieux à la dégradation par les  $\beta$ -lactamases, les céphalosporines de troisième génération présentant un spectre d'effet encore plus large vis-à-vis des bactéries Gram négatives.

Parmi les céphalosporines de seconde et troisième génération, on peut citer : loracarbef, cefaclor, cefuroxime, cefprozil, cefoxitin (cefoxitan), cefamandole, 20 cefotian, cefotetan, cefmetazole, cefocinide, ceforanide, cefpodoxime, cefixime, cefotaxime, ceftizoxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefmenoxime, cefodizime, cefoperazone, cefepime, cefpirome, cefsulfonide, cefetamete, ceftibutene, moxalactam, latamoxef, notamment sous forme de sels (sodiques). L'homme du métier peut obtenir des listes de tels composés, notamment sur Internet au site 25 [www.biam2.org](http://www.biam2.org) ou [www.fpnotebook.com](http://www.fpnotebook.com).

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le cefamandole.

Dans un autre mode de réalisation, ledit antibiotique est choisi dans le groupe des céphamicines (cefoxitine, cefotetan, cefmetazole, cefbupérazone, cefminox) et des oxacephems (moxalactam ou latamoxef).



Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est la cefoxitine.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le cefmetazole.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le moxalactam.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le cefotetan.

5 Dans un mode de réalisation préféré, lesdits microorganismes sont des staphylocoques, et on utilise préférentiellement un agent chromogène choisi dans le groupe constitué du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside, ainsi que décrit dans la demande WO 00/53799.

Les milieux de culture de *S. aureus* sont connus et décrits notamment dans  
10 le manuel "Oxoïd Unipath Limited", Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 OPW, Angleterre. Il peut s'agir, par exemple de "Nutrient Agar Oxoïd CM3", milieu essentiellement à base d'extraits de levure, de peptone et d'agar.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit milieu de culture contient à la fois  
15 du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside.

Dans un mode de réalisation particulier, le milieu de culture selon l'invention comporte, en outre, au moins l'un des deux agents chromogènes suivants : 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside et 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide.

20 Dans un mode de réalisation particulier, ledit milieu contient en outre de la déféroxamine. La déféroxamine permet en effet d'inhiber *Staphylococcus epidermis* sans inhiber *Staphylococcus aureus*, la concentration mise en oeuvre sera de préférence comprise entre 0,01 et 0,10 g/l.

Dans un mode de réalisation, le milieu selon l'invention contient également  
25 un antibiotique glycopeptide choisi dans le groupe constitué de la vancomycine, la teicoplanine et l'avoparcine et leurs mélanges, afin de détecter les microorganismes résistants à la fois à la méticilline et à la vancomycine. On peut utiliser environ de 5 mg/l à 50 mg/l de ces antibiotiques, plus particulièrement de 5 mg/l à 30 mg/l, de 10 mg/l à 30 mg/l, environ 25 mg/l.

30 Dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont montré qu'il n'est pas nécessaire d'avoir une forte charge osmotique dans le milieu de culture. Ainsi, contrairement aux milieux de détection de staphylocoques dorés résistants à la méticilline, utilisant l'oxacilline comme antibiotique, dans lesquels on ajoute du

chlorure de sodium, le milieu de culture de l'invention est également fonctionnel avec une concentration de sodium inférieure à 3 %, et égale à environ 2-2,5 %. Les conditions d'incubation peuvent être adaptées en fonction de la quantité de chlorure de sodium dans le milieu (durée d'incubation, température plus ou moins élevée...).

5 La concentration en antibiotique dans le milieu selon l'invention est de préférence comprise entre 0,5 et 50 mg/l, de préférence 1,5 et 30 mg/l, en particulier 1,5 et 15 mg/l. Quelques essais de routine permettent à l'homme du métier de l'ajuster en fonction de la CMI (concentration minimale d'inhibition, concentration minimale pour laquelle aucune croissance des microorganismes n'est détectée) des  
10 microorganismes considérés pour l'antibiotique considéré.

Les milieux selon la présente invention contiendront, de préférence, de 0,01 à 0,50 g/l, notamment de 0,05 à 0,40 g/l de 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate, de préférence de 0,01 à 0,20 g/l de 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside, de préférence de 0,01 à 0,20 g/l de 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl  
15 galactoside, de préférence de 0,01 à 0,20 g/l de 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide.

L'invention se rapporte également à l'utilisation d'un milieu selon l'invention pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline.

L'invention se rapporte également à un procédé de détection de  
20 microorganismes résistants à la méticilline dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à :

- inoculer un milieu selon l'invention avec ledit échantillon ou un inoculum issu dudit échantillon,
- incuber ledit milieu dans des conditions permettant la croissance  
25 desdits microorganismes,
- détecter, sur ledit milieu, la présence desdits microorganismes résistants à la méticilline, par la présence de colonies colorées.

Les conditions d'incubation sont connues de l'homme du métier, et on utilise généralement une incubation à des températures comprises entre 25°C et  
30 42°C, de préférence entre 30°C et 38°C.

Les durées d'incubation sont classiques (environ 24 heures).

Selon le microorganisme considéré, on peut utiliser une durée d'incubation plus courte ou plus longue, travailler dans des conditions aérobies ou anaérobies...

Le milieu selon l'invention permet notamment de détecter aisément les staphylocoques résistants à la méthycilline, en réduisant le temps d'analyse. La combinaison des antibiotiques choisis dans le cadre de l'invention et des agents chromogènes permet en effet de réduire le nombre de faux positifs et de faux négatifs, et de diminuer ainsi le besoin de réaliser des analyses complémentaires.

## EXEMPLES

### Exemple 1

Composition d'un milieu selon l'invention pour la détection de *S. aureus* résistants à la méticilline :

- Peptone et extrait de levure 40 g/l
- NaCl 25 g/l
- 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate 0,10 g/l
- 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside 0,05 g/l
- 15 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside 0,05 g/l
- 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide 0,05 g/l
- Déféroxamine 0,050 g/l
- Agar 15 g/l

On ajoute, dans ce milieu, de l'oxacilline (6 mg/ml) ou de la cefoxitine (5 mg/l), après autoclavage, avant que le milieu ne soit solide (lorsqu'il est à une température d'environ 45 °C).

Ce milieu contient du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside, permettant la détection spécifique des staphylocoques dorés (coloration mauve des colonies), ainsi que du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide, pour colorer les autres microorganismes pouvant être présents dans l'inoculum.

### Exemple 2

Etude de la croissance de souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline sur le milieu CHROMagar Staph aureus (disponible par la société CHROMagar, 4, Place du 18 Juin 1940, 75006 Paris-France) :

AR4295 MetiS : souche sensible à la méticilline

AR4297 MetiR : souche résistante à la méticilline (homogène)

MRhet : souche résistante à la méticilline (hétérogène)

Z252 : souche résistante à la méticilline, homogène, faible niveau de résistance

	AR4295 MetiS	AR4297 MetiR	MRhet	Z252
CHROMagar Staph aureus	+	+	+	+
CHROMagar Staph aureus + oxacilline 6 mg/ml	-	+/-*	-	-
CHROMagar Staph aureus + Cefoxitine 5 mg/l	-	+	+	+

+ = croissance de colonies ; - = pas de croissance ; \* = microcolonies

5

On inocule les boîtes de Pétri avec des cultures bactériennes en striant les boîtes, pour observer la croissance de bactéries isolées, après incubation à 37°C pendant 24 heures.

Les bactéries qui croissent donnent des colonies mauves sur le milieu de culture, confirmant que les microorganismes sont des staphylocoques dorés.

10

Ainsi, le milieu selon l'invention permet de détecter directement les staphylocoques dorés résistants à la méticilline, y compris les souches hétérogènes ou à faible niveau de résistance, du fait de la combinaison de la croissance des bactéries et de la

15 coloration des colonies.

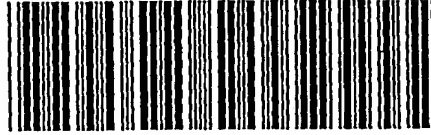
### Revendications

1. Milieu pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline, comprenant, outre des nutriments permettant la croissance desdits microorganismes, un antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines de seconde ou de troisième génération, et un agent chromogène libérant un chromophore après hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.
2. Milieu selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdits microorganismes sont des staphylocoques, en particulier des staphylocoques dorés.
3. Milieu selon la revendication 2, dans lequel ledit agent chromogène est choisi dans le groupe constitué du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside.
4. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit antibiotique est le cefamandole.
5. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit antibiotique est choisi dans le groupe des céphamicines et des oxacephems.
6. Milieu selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit antibiotique est choisi dans le groupe constitué de la cefoxitine, le cefmetazole, le moxalactam, et le cefotetan.
7. Milieu selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisé en ce qu'il contient du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside.
8. Milieu selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte, en outre, au moins l'un des deux agents chromogènes suivants : 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside et 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide.
9. Milieu selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisé en ce qu'il contient, en outre, un antibiotique choisi dans le groupe constitué de la vancomycine, la teicoplanine, l'avoparcine, et leurs mélanges.
10. Milieu selon l'une des revendications 2 à 9, caractérisé en ce que la concentration en chlorure de sodium est inférieure à 3 %.

11. Milieu selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la concentration en antibiotique est comprise entre 0,5 et 50 mg/l.
12. Milieu selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la concentration d'un agent chromogène est comprise entre 0,01 et 0,5 g/l.
- 5 13. Utilisation d'un milieu selon l'une des revendications 1 à 12 pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline.
14. Procédé de détection de microorganismes résistants à la méticilline dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à :
- 10       - inoculer un milieu selon l'une des revendications 1 à 12 avec ledit échantillon ou un inoculum issu dudit échantillon,
- incuber ledit milieu dans des conditions permettant la croissance desdits microorganismes,
- 15       - détecter, sur ledit milieu, la présence desdits microorganismes résistants à la méticilline, par la présence de colonies colorées.

PCT Application

**FR0302788**



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**